

201024190A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

ゲノムコピー数異常を伴う先天奇形症候群（ウォルフヒルシュホーン  
症候群を含む）の診断法の確立と患者数の把握に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 福嶋義光

平成23（2011）年 5月

## 目次

I. 総括研究報告	
ゲノムコピー数異常を伴う先天奇形症候群（ウォルフヒルシュホーン症候群を含む）の診断法の確立と患者数の把握に関する研究	
福嶋義光 .....	1
II. 分担研究報告	
1. ゲノムコピー数異常を伴う先天奇形症候群（ウォルフヒルシュホーン症候群を含む）の診断法の確立と患者数の把握に関する研究	
－ ゲノムアレイ解析 －	
涌井敬子 .....	7
（別添資料）	
2. ゲノムコピー数異常を伴う先天奇形症候群（ウォルフヒルシュホーン症候群を含む）の診断法の確立と患者数の把握に関する研究	
－ 症例検討・情報提供 －	
古庄知己 .....	21
鳴海洋子 .....	
3. ゲノムコピー数異常を伴う先天奇形症候群（ウォルフヒルシュホーン症候群を含む）の診断法の確立と患者数の把握に関する研究	
－ ウォルフヒルシュホーン症候群における欠失領域と臨床症状との相関の検討 －	
大橋博文 .....	23
4. ゲノムコピー数異常を伴う先天奇形症候群（ウォルフヒルシュホーン症候群を含む）の診断法の確立と患者数の把握に関する研究	
－ ウォルフヒルシュホーン症候群における頻度の研究 －	
川目裕 .....	27
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	31

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
総括研究報告書

ゲノムコピー数異常を伴う先天奇形症候群（ウォルフヒルシュホーン症候群を含む）の診断法の確立と患者数の把握に関する研究

研究代表者 福嶋義光 信州大学医学部 教授

Wolf-Hirschhorn 症候群を含む先天奇形症候群の診断精度を向上させ、染色体の量的変化と臨床症状との関連を明らかにするために、ゲノム上のコピー数の変化を網羅的に検出するゲノムアレイ解析法を用いて、次の研究を行った。

- 1) Wolf-Hirschhorn 症候群の欠失範囲と臨床症状との関係を明らかにする。
- 2) 原因不明の先天奇形症候群とゲノムコピー数異常の関係を明らかにする。
- 3) ゲノムアレイ解析で問題となる CNV (copy number variation) について、日本人のデータを集積し、精度の高いゲノムアレイ解析法を確立する。

ゲノムアレイ解析を行った Wolf-Hirschhorn 症候群 20 症例では、欠失範囲が大きくなるにつれ、合併症や精神遅滞の程度が重症化する傾向がみられた。また、原因不明の多発奇形/精神遅滞症候群 (MCA/MR syndrome) 101 例を対象に行ったゲノムアレイ解析では、全症例に何らかのゲノムコピー数の変化を認め、そのうち少なくとも 10 例 (9.9%) は臨床症状と関連があるコピー数異常の可能性が高いと考えられた。既知の染色体異常例 28 例の解析では、ゲノムの欠失・重複範囲を詳細に特定すると同時に、複雑な染色体再構成の評価に有用であった。ゲノムアレイ解析は先天奇形症候群の診断に有用であるが、適切にコピー数の変化を評価するためには、必要に応じて患者および両親の metaphase FISH 解析を実施するなど追加解析を行う必要がある。また、臨床症状に直接関係しないコピー数多型 (CNV) に関して今後日本人を対象としたデータベース構築が必要である。

分担研究者

涌井敬子（信州大学医学部）  
古庄知己（信州大学医学部附属病院）  
鳴海洋子（信州大学医学部）  
大橋博文（埼玉県立小児医療センター）  
川目 裕（お茶の水女子大学）

A. 研究目的

従来、先天奇形症候群の診断は、臨床症状の組み合わせを根拠に主観的になされることが多く、診断精度は限られたものであった。ウォルフヒルシュホーン症候群 (WHS) は 4 番染色体短腕に位置する遺伝子群の欠失により引き起こされる疾患であり、重度精神遅滞、成長障害、難治性てんかん、多発奇形を主徴とする疾患で、頻度は約 5 万人に 1 人と推定されているが、正確な発生頻度は明らかにされていない。本症候群の一部は染色体検査により 4 番染色体短腕の部分欠失を検出できる場合があるが、顕微鏡観察により行われる染色体検査では明らかな異常を検出できない症例も数多く存在

する。近年、ゲノム上のコピー数の変化を網羅的に検出するゲノムアレイ解析法が開発され、数多くの先天奇形症候群とゲノムコピー数異常との関係が明らかにされつつある。本研究の目的は、WHS を含む先天奇形症候群のゲノムアレイ解析技術を用いた診断法を確立し、この方法を用いて、わが国における診断未確定の先天奇形症候群患者を解析し、ゲノムコピー数異常を有する患者の頻度を明らかにすることにより、わが国の WHS を含む先天奇形症候群の患者数を把握することである。

B. 研究方法

①解析対象症例の集積とサンプル収集

埼玉県立小児医療センター遺伝科は 1985 年から約四半世紀にわたり、先天異常児の診療のレベル向上に努めてきた医療機関である。代表的先天異常であるダウン症候群では、埼玉県で出生する罹患児の 80-90% が当センターを受診しているため、ウォルフヒルシュホーン症候群を含む先天奇形症候群においても、そのほとんどが当センターを受診していると考えられ

る。同様に、日本小児遺伝学会Dysmorphologyのタベ実行委員会委員が所属する施設では、先天奇形症候群のほとんどが受診する状況になっているため、これらの施設を受診している診断未確定の症例の中から、ゲノムコピー数異常の可能性が高いと考えられる症例を解析対象とする。

#### ②ウォルフヒルシュホーン症候群の患者数把握

日本小児遺伝学会 Dysmorphology のタベ実行委員会の委員の所属する医療機関に受診し、G分染法、FISH法、マイクロアレイ法によって欠失を認めたWHS症例。2005年より2009年までの症例数、欠失のタイプについて調査票により収集する。各医療機関におけるWHSの受診率とダウン症候群の受診率とが同程度と仮定し、ダウン症候群の発生頻度を800出生にひとりとして推定する。

#### ③ゲノムアレイ解析

Signature Genomics社のデザインによる135Kのオリゴプローブを搭載したNimbleGen CGX array (SignatureChipOS™)を用いて、専用解析ソフトGenoglyphix®により、ウォルフヒルシュホーン症候群を含む先天奇形症候群患者のゲノムアレイ解析を実施する。その際、ゲノムアレイ技術のさまざまな問題点を明らかにし、それらの問題を克服しつつ、結果を適切に臨床応用するための条件や課題を検討する。

染色体検査は、ゲノムコピー数の異常（トリソミー、モノソミー）および大きなゲノムの位置変化（転座、逆位等）を検出することができる技術であるが、顕微鏡で観察できる大きさ以上、すなわちDNAレベルでは3-6 Mb以上の変化がないと検出ができない。全ゲノムを対象に数十kb程度の微細なゲノムコピー数の異常の検出を可能としたゲノムアレイ技術により、いくつかの先天奇形症候群において微細なゲノムコピー数異常との関連が明らかにされてきた。ゲノムアレイ解析では、検出されたゲノムコピー数異常が、臨床症状と関連があるか否かという結果の解釈（臨床的評価）が重要である。ヒトには病気の発症とは関係のないコピー数多型（Copy Number Variation: CNV）を示す領域が多数存在することが明らかにされており、ゲノムアレイ解析を行う際には、CNVとの鑑別を考慮しておかなければならないが、CNVに関

する情報は未だ十分でない。そこで4万症例の解析データを参考にできる解析ソフトGenoglyphix®を利用する。しかしながら、Genoglyphix®に登録されているデータは主に米国人の結果であり、日本人のCNVのデータベースを新たに構築していく必要があることを考慮した上で解析を進めた。

#### ④ウォルフヒルシュホーン症候群の予後予測

すでに3施設で診断されているウォルフヒルシュホーン症候群患者、および本研究により新たに診断された患者の詳しい臨床症状を集め、ゲノムコピー数異常の部位・範囲との関係を明らかにする。本症では成長障害、精神遅滞、筋緊張低下、摂食障害、てんかん、難聴、先天性心疾患、唇裂口蓋裂、性腺・腎尿路障害、脳形態異常、などさまざまな障害が起こりうるが、ゲノムコピー数異常の部位・範囲との関連を明らかにすることにより、本症の予後予測・早期治療に結びつける。

#### ⑤ウォルフヒルシュホーン症候群についての情報提供と情報収集

1) 遺伝情報サイトであるGeneReviews Japan <<http://grj.umin.jp/>>にウォルフヒルシュホーン症候群に関する最新情報（疾患の特徴、頻度、診断・検査、鑑別診断、臨床像、合併症、マネージメント、遺伝カウンセリング等）を継続して掲載する。

#### 2) 系統的レビューのための文献検索

Aの2つのキーワード、それぞれにBのキーワードをANDで（すなわち6通りの組み合わせ）にて検索をおこなった。データベースは、米国立医学図書館国立生物工学情報センターの医学・生物文献データベースであるPubMedを対象とした。

#### キーワードA

1. Wolf-Hirschhorn syndrome
2. 4p deletion syndrome

#### キーワードB

1. Management
2. History
3. Clinical

#### C. 研究結果

##### ①解析症例数

本研究により、2011年3月末までに47家系、計149名の患者、およびその親の血液試料から、

直接 DNA 抽出するとともに、染色体検査用固定細胞を準備した。

## ②WHS の発生頻度

各医療機関（6施設）に受診中の WHS 症例の 2005 年から 2009 年の出生年別症例の数は、0 例から 3 例であった。5 年間の総数から 1 年の平均症例は、0.2 から 1.8 例であった。一方でダウン症候群は、各施設間で大きく異なり、1 年の平均症例 7 例から 74 例の施設と幅があった。次に施設ごとに WHS 症例のダウン症候群症例に対する割合を求めた。WHS はダウン症候群に比して平均 2.6%（0.8%から 4.7%、中央値 2.65%）であった。ダウン症候群と WHS が各医療機関に同じ割合にて受診すると仮定し、ダウン症候群の出生率を 800 出生にひとりとする、WHS の出生率は、約 31,000 出生にひとり（1/17,000 から 1/100,000 出生）と推測された。

## ③WHS のゲノムコピー数異常

WHS 患者 20 症例のゲノムアレイ解析を行った結果、4 番染色体短腕に認めた欠失の最小サイズは 2.0Mb、最大は 29.4Mb であった。2 例は 4 番染色体の欠失範囲が同一であったが、他はすべて欠失範囲が異なっていた。5Mb ほどの分布は 5~10Mb が 9 例と 45%を占め、そのうち 8Mb 台の欠失が 5 例（25%）と比較的集中していた。また、欠失のタイプは、端部欠失 13 例（65%）、中間部欠失 3 例（15%）、不均衡型転座 3 例（FISH 解析未確認症例 1 例を含む）（15%）、その他 1 例（5%）であった。なお、欠失範囲の一致していた 2 例のうち 1 例は端部欠失、1 例は不均衡型構造異常であり、本研究でこれまでにゲノムアレイ解析した 20 症例の WHS 患者は、それぞれ異なる 4 番染色体構造異常を有していた。

## ④WHS におけるゲノムコピー数異常と臨床症状

今年度は、マイクロアレイ法によりゲノムコピー数異常が判明した 5 例について、ゲノムコピー数異常の範囲と臨床症状との関連を検討した。最も注意すべき合併症であるけいれんにおいては、欠失範囲が比較的小さい 2.9Mb と 5.5Mb の 2 症例については、発症年齢が遅く重積経験もなかったが、7Mb を超える欠失範囲の大きい 3 症例については発症年齢が早く重積歴もあり、特に乳幼児期のけいれんの重症度に差を認めた。他の身体合併症、運動発達において

も、欠失範囲の大きさと重症度に大まかな関連を認めた。

## ⑤原因不明の多発奇形/精神遅滞症候群（MCA/MR syndrome）の解析

101 症例を解析し、検出されたゲノムコピー数異常が患者の臨床症状と関連があるかどうかの判断を以下の基準を設けて行った。

1) clinically significant（患者の臨床症状と関連がある）：検出したゲノムコピー数異常領域に既知の奇形症候群が知られている、あるいは臨床的影響との関連や機能の判明している既知の遺伝子が存在し、且つ bCNVs 領域ではない場合

2) unclear clinical significance（患者の臨床症状との関連は不確定）：1) と 3) とともに確定できない場合

3) thought to be benign（患者の臨床症状には影響していない可能性が高い）：Genoglyphix<sup>®</sup>や Database of Genomic Variants（DGV, Nov 2010）に bCNVs として登録されているゲノムコピー数変化、および当研究室において異なる 5 家系以上の健常人で認められたゲノムコピー数変化の場合

少なくとも 10 例（9.9%）は臨床的に意味のあるゲノムコピー数異常の可能性が高いと考えられたが、今後さらに、各症例の異常領域ごとに、適切な DNA クローンデータベースから選択し、これをプローブとして患者・両親の染色体検査用固定細胞標本への metaphase FISH 解析などの追加解析により、ゲノムコピー数異常に伴う染色体再構成について分子細胞遺伝学的に確認する必要がある。

## ⑥既知の染色体異常患者

すでに、G 分染法あるいは FISH 法による染色体検査により、染色体異常が判明している、染色体異常に伴うゲノムの欠失・重複範囲の詳細な特定や染色体再構成の再確認が有用と考えられた 28 症例について、ゲノムアレイ解析を行った。

G 分染法あるいは FISH 法で不均衡型構造異常が判明していた 23 症例のうち低頻度モザイク症例以外はすべて、検出されていた構造異常染色体に関して欠失・重複の範囲を詳細に特定できた。由来不明の marker 染色体を有していた 2 症例はその由来染色体を推測する結果が得られた。不均衡型構造異常 23 症例のうち 7 例に

については、従来の核型分析では確定できない複雑な染色体再構成であったことが判明した。

また、均衡型構造異常と考えられていた4症例の解析では、2症例は、bCNVsと考えられるコピー数異常のみであったが、他の2症例には新たなゲノムコピー数変化を検出した。

いずれの染色体構造異常も、判明したゲノムコピー数異常の情報をもとに選択したプローブを用いて、metaphase FISH解析による染色体再構成の確認が有用であった。

#### ⑦ウォルフヒルシュホーン症候群についての情報提供

1) 遺伝情報サイトであるGeneReviews Japan <<http://grj.umin.jp/>>にウォルフヒルシュホーン症候群に関する最新情報(疾患の特徴、頻度、診断・検査、鑑別診断、臨床像、合併症、マネージメント、遺伝カウンセリング等)を継続して掲載している。

#### 2) 系統的レビューのための文献検索

2001年から2010年までの間に方法に示したキーワードで検索した結果、重複を除くと82件の文献が得られた。

#### D. 考察

多くの染色体異常症や先天奇形症候群患者が定期的フォローアップのために受診している全国の小児遺伝医療の中核的専門施設におけるWHS患者数とダウン症候群患者数の比から、WHSの出生率は、約31,000出生にひとりであり、毎年35名程度のWHS患者がわが国では生まれていると推定される。

WHS患者・家族、および対応する医師にとって、合併症の重症度、自然歴などの予後予測に関する情報は極めて重要である。ゲノムアレイ解析を行ったWHS20症例では、欠失のサイズは最小2.0Mbから最大は29.4Mbまで幅広く分布しており、全ての症例はそれぞれ異なる4番染色体構造異常を有していることが明らかになった。今後、臨床症状とゲノムコピー数異常部位との関連を詳細に検討し、異常部位ごとの自然歴を明らかにする研究が可能となることを示すことができたのは意義深い。

また、ゲノムアレイ解析を行うことにより、他の微細欠失症候群と異なり、WHSにおいては、共通の構造異常を来しやすいホットスポットが存在しないことが明らかにされた点は細胞遺伝学的に興味深い。

先天奇形症候群の診断は主観的判断によって

行われたり、染色体検査ではその一部しか検出することができないため、診断されない例が数多く存在すると想定される。実際に、本研究において、原因不明の多発奇形/精神遅滞(MCA/MR)患者101例のゲノムアレイ解析を行ったところ、少なくとも10症例(9.9%)は、「clinically significant」、すなわち検出したゲノムコピー数異常領域に既知の奇形症候群が知られている、あるいは臨床的影響との関連や機能の判明している既知の遺伝子が存在する、と判定された。従来の染色体検査法では診断できなかったものが、ゲノムアレイ解析によって、確定診断を行うことができたのである。先天性の疾患で、診断がなされない状態は、両親の不安が大きく、診断されるまでに数多くの無用な検査がなされることになる。本研究の推進により、先天奇形症候群の診断方法を確立することは、診断未確定症例を解消させ、無用な検査費用の削減につながる。さらに、ゲノムコピー数異常の原因が、親由来のもので次子も同様の状態になる可能性があるものなのか、de novo(突然変異)によるもので次子には影響を与えないものであるのかを明確にすることができ、両親の不安を軽減することができると考えられる。ゲノムアレイ解析は先天異常症の医療には欠かすことのできない技術であることを明らかにすることができた。

WHSのゲノムアレイ解析の結果、欠失範囲が大きくなるにつれ、合併症や精神遅滞の程度が重症化する傾向があることが明らかとなった。WHSは重度精神遅滞、成長障害、難治性てんかん、多発奇形のために、長期にわたる治療・ケアが必要であり、患者や家族の負担は大きい。将来予測についての情報は、両親の不安の軽減に役立つ。

WHSに関する情報提供としては、昨年度に引き続き、遺伝情報サイトGeneReviews Japanに継続して最新情報を掲載するほか、今年度は、系統的レビューのための文献検索を開始した。計82件の論文が検索できたので、次年度、詳細に解析し、逐次、患者・家族・医療者向けに情報提供を行う予定である。

ゲノムアレイ解析は先天奇形症候群の診断に大変有用であるが、適切な臨床的評価には、必要に応じて実施する追加解析の結果もあわせて総合的に解釈することが必要である。特に、ゲノムコピー数異常の大きさ、異常領域に含まれる遺伝子、および病気の原因とは直接関係のないCNVかどうか、の3点に留意して評価する

必要があり、さらにゲノムコピー数異常に伴う染色体再構成についても確認する必要がある。ゲノムアレイ解析技術を適切に臨床応用するために、日本人 CNV データベースを構築する必要がある。本研究実施により、一般健常成人においても複数のゲノムコピー数変化を観察しており、日本人症例を対象にゲノムアレイ解析を実施する際の留意点を示すことができた。本研究は WHS ばかりではなく、他の先天奇形症候群の診断にも役立てられるものであると考える。

## E. 結論

ゲノムコピー数異常を伴う先天奇形症候群の診断にゲノムアレイ技術は極めて有効であるが、最終的な診断を下すためには、日本人の CNV に関する情報の集積が必要である。

## F. 健康危険情報

本研究課題では健康危機に関わる問題は生じない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- Kosho T, Miyake N, Hatamochi A, Takahashi J, Kato H, Miyahara T, Igawa Y, Yasui H, Ishida T, Ono K, Kosuda T, Inoue A, Kohyama M, Hattori T, Ohashi H, Nishimura G, Kawamura R, Wakui K, Fukushima Y, Matsumoto N. A New Ehlers-Danlos Syndrome With Craniofacial Characteristics, Multiple Congenital Contractures, Progressive Joint and Skin Laxity, and Multisystem Fragility-related Manifestations. *Am J Med Genet A* 2010;152A:1333-46
- Muramatsu Y, Kosho T (corresponding author), Magota M, Yokotsuka T, Ito M, Yasuda A, Kito O, Suzuki C, Nagata Y, Kawai S, Ikoma M, Hatano T, Nakayama M, Kawamura R, Wakui K, Morisaki H, Morisaki T, Fukushima Y. Progressive aortic root and pulmonary artery aneurysms in a neonate with Loeys-Dietz syndrome type 1B. *Am J Med Genet A*. 2010 Feb;152A(2):417-21.
- Yamazaki M, Kosho T (equal contribution, corresponding author), Kawachi S, Mikoshiba M, Takahashi J, Sano R, Oka K, Yoshida K, Watanabe T, Kato H, Komatsu M, Kawamura R, Wakui K, Knappskog PM, Boman H, Fukushima Y. Cold-induced sweating syndrome with neonatal features of Crisponi syndrome: longitudinal observation of a patient homozygous for a CRLF1 mutation. *Am J Med Genet A*. 2010 Mar;152A(3):764-9.
- Sekijima Y, Ohashi T, Ohira S, Kosho T, Fukushima Y: Successful pregnancy and lactation outcome in a patient with Gaucher disease receiving enzyme replacement therapy, and the subsequent distribution and excretion of imiglucerase in human breast milk. *Clinical Therapeutics* 31:2048-2052, 2010
- Nakamura K, Sekijima Y, Nakamura K, Hattori K, Nagamatsu K, Shimizu Y, Yasude T, Ushiyama M, Endo F, Fukushima Y, Ikeda S: Cerebral hemorrhage in Fabry's disease. *J Hum Genet* 55:259-261, 2010
- Narumi Y, Kosho T, Tsuruta G, Shiohara M, Shimazaki E, Mori T, Shimizu A, Igawa Y, Nishizawa S, Takagi K, Kawamura R, Wakui K, Fukushima Y: Genital abnormalities I Pallister-Hall syndrome: Report of two patients and review of the literature. *Am J Med Genet* 152A:3143-3147, 2010
- Onouchi Y, Ozaki K, Buns JC, Shimizu C, Hamada H, Honda T, Terai M, Honda A, Takeuchi T, Shibuta S, Suenaga T, Suzuki H, Higashi K, Yasukawa K, Suzuki Y, Sasago K, Kemmotsu Y, Takatsuki S, Saji T, Yoshikawa T, Nagai T, Hamamoto K, Kishi F, Ouchi K, Sato Y, Newburger JW, Baker AL, Shulman ST, Rowley AH, Yashiro M, Nakamura Y, Wakui K, Fukushima Y, Fujino A, Tsunoda T, Kawasaki T, Hata A, Nakamura Y, Tanaka T: Common Variants in *CASP3* confer susceptibility to Kawasaki disease. *Human Molecular Genetics* 19:2898-2906, 2010
- Miyake N, Kosho T, Mizumoto S, Furuichi T, Hatamochi A, Nagashima Y, Arai E, Takahashi K, Kawamura R, Wakui K, Takahashi J, Kato H, Yasui H, Ishida T, Ohashi H, Nishimura G, Shiina M, Saitsu H, Tsurusaki Y, Doi H, Fukushima Y, Ikegawa S, Yamada S, Sugahara K, Matsumoto N: Loss-of-function mutations of *CHST14* in a new type of Ehlers-Danlos syndrome. *Hum Mutat.* 2010; 31:966-74.
- Nishimura-Tadaki A, Wada T, Bano G, Gough K, Warner J, Kosho T, Ando N, Hamanoue H, Sakakibara H, Nishimura G, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Wakui K, Saitsu H, Fukushima Y, Hirahara F, Matsumoto N. Breakpoint determination of X;autosome balanced translocations in four patients with premature ovarian failure. *J Hum Genet.* 2011 Feb;56(2):156-60.
- Hayashi S, Imoto I, Aizu Y, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Okamoto N, Honda S, Araki S, Mizutani S, Numabe H, Saitoh S, Kosho T, Fukushima Y, Mitsubuchi H, Endo F, Chinen Y, Kosaki R, Okuyama T, Ohki H, Yoshihashi H, Ono M, Takada F, Ono H, Yagi M, Matsumoto H, Makita Y, Hata A, Inazawa J. Clinical application of array-based comparative genomic hybridization by two-stage screening for 536 patients with mental retardation and multiple congenital anomalies. *J Hum Genet.* 2011 Feb;56(2):110-24.
- Shimaoka Y, Kosho T, Wataya-Kaneda M, Funakoshi M, Suzuki T, Hayashi S, Mitsuhashi Y, Isei T, Aoki Y, Yamazaki K, Ono M, Makino K, Tanaka T, Kunii E, Hatamochi A. Clinical and genetic features of 20 Japanese patients with vascular-type Ehlers-Danlos syndrome. *Br J Dermatol.* 2010 Oct;163(4):704-10.
- Goto Y, Uhara H, Murata H, Koga H, Kosho T, Yamazaki M, Takata M, Okuyama R. Leg ulcers associated with positive lupus anticoagulant in two cases of Klinefelter's syndrome. *Acta Derm Venereol.* 2011 Jan;91(1):90-1.

- 福嶋義光:診療のための遺伝医学関連ガイドライン(特集:臨床遺伝学の進歩と日常診療). 日本医師会雑誌 139:604, 2010
- 福嶋義光:遺伝子解析(特集:産婦人科に関わる法と倫理の現状). 産婦人科の実際 59:2185-2190, 2010
- 福嶋義光:遺伝子診療と倫理(特集:遺伝性消化管疾患の特徴と長期経過). 胃と腸 45: 2101-2103,2010
- 福嶋義光:遺伝子診療学とは. 遺伝子診療学(第2版) 遺伝子診断の進歩とゲノム治療の展望. 日本臨床 68:1-3, 2010
- 涌井敬子, 福嶋義光: I. 染色体検査・遺伝子関連検査総論, II. 染色体検査(第13章). 「臨床検査法提要 改訂第33版」(監修:金井正光). 金原出版 pp.1113-1164, 2010
- 福嶋義光:遺伝子研究・診断・治療の倫理(特集:糖尿病と遺伝子). 月刊糖尿病 3 (4):114-119, 2011
- 福嶋義光:臨床遺伝医療. BIO Clinica 26:271-275,2011
- 福嶋義光:ミラー・ディーカー症候群. 症候群ハンドブック(井村裕夫総編集). 中山書店. p.611, 2011
- 福嶋義光:オーダーメイド医療. 各論IV ゲノム医科学の分子予防医学への統合. 分子予防環境医学 - 生命科学研究の予防・環境医学への統合 - (分子予防環境医学研究会編) 森の泉社 pp.751-759, 2010
- 古庄知己, 渡邊淳, 森崎裕子, 福嶋義光, 簗持淳. 難治性疾患克服研究事業による血管型エーラスダンロス症候群の実態調査. 日本遺伝カウンセリング学会誌 第31巻3号:157-161, 2010. 12月
- 古庄知己. 奇形・染色体異常の遺伝カウンセリング. 小児科診療 2010年増刊号 小児の治療指針. 906-909, 2010(4月30日).
- 古庄知己. 先天異常児の発達支援. 特集「周産期医療がめざすディベロプメンタルケアー胎児期からはじめる発達支援」周産期医学 第40巻第5号: 615-618, 2010(5月10日)
- 古庄知己. 遺伝子診療部の活動と最近のトピック 「信大病院の窓」松本市医師会会報 第509号 8-12, 2010(10月号)
- 古庄知己. 脱臼, 皮膚裂傷を繰り返す 30歳女性. 視診・触診でわかる内科疾患の診かたー診断力がアップする厳選症例100問 金原出版 69-70, 2010(12月20日)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

ゲノムコピー数異常を伴う先天奇形症候群（ウォルフヒルシュホーン症候群を含む）の診断法の確立と患者数の把握に関する研究  
- ゲノムアレイ解析 -

研究分担者 涌井敬子 信州大学医学部助教

ゲノムコピー数異常を伴う可能性のある、ウォルフヒルシュホーン症候群を含む先天奇形症候群を対象として実施した149症例のゲノムアレイ解析を通して、臨床応用のための標準化を視野に、解析方法および結果の評価方法について検討した。ゲノムアレイ解析は今後の医療に必須となる有用な診断法であるが、臨床検査として適切に実施してゆくためには、必要に応じて両親のアレイ解析や患者および両親の metaphase FISH解析による染色体再構成の検証を実施できる体制が必要で、結果を細胞遺伝学的に総合的に解釈することが重要である。

A. 研究目的

ウォルフヒルシュホーン症候群（Wolf-Hirschhorn; WHS）を含む先天奇形症候群患者にゲノムアレイ解析を実施し、臨床検査としてゲノムアレイ解析を実施する際の標準化を視野に、具体的な方法および結果の評価方法について検討する。

B. 研究方法

① 試料処理

本研究目的に収集された、WHSを含むゲノムアレイ解析が有用な先天奇形症候群患者および協力の得られた両親の末梢血（ヘパリン採血あるいはEDTA採血）を試料とした。基本的には、ゲノムアレイ解析目的の一部をGentra Puregene Blood Kit (Qiagen) を用いてゲノムDNAを抽出、250~1000ng/ $\mu$ l濃度に調整し、一部をゲノムアレイ解析により検出されるゲノムコピー数異常に伴う染色体構成を確認することが必要になった場合に備え、染色体検査用の培養~低調処理~固定を行った。

② ゲノムアレイ解析

Signature Genomics社のデザインによる、全ゲノム領域にわたる約35kb間隔のバックボーンプローブと、200以上の既知の染色体異常領域、41のサブテロメア領域、43のペリセントロメア領域を含む計700以上のターゲット領域については約10kb間隔に、計134829種類の

オリゴプローブを搭載したNimbleGen CGX array (SignatureChip0S™) (Roche) を用いてCGH法によるゲノムアレイ解析を行った。

Nimblegen Arrays User's Guideのプロトコルに従い、患者あるいは一部の親の試料とレファランス試料のゲノムDNA各1 $\mu$ gをそれぞれCy5とCy3の異なる蛍光色素にて標識、等量混合・調整した溶液をCGX arrayにアプライ、数日間ハイブリダイズさせたのち洗浄・乾燥させ、MS200 Microarray Scannerにてスキャンした。NimbleScanにより取り込んだスキャンイメージをGGXファイルに変換し、CGX array専用の解析ソフト Genoglyphix®を利用して各試料におけるゲノムコピー数異常の検出と評価を行った。

ゲノムアレイ解析では、ゲノムコピー数変化を検出した後、その異常が患者の臨床症状と関連があるかどうかについての評価が大変重要である。患者に検出されたゲノムコピー数変化を、1) 患者の臨床症状と関連がある (clinically significant)、2) 患者の臨床症状との関連は不確定 (unclear clinically significance)、3) 患者の臨床症状には影響していない可能性が高い (thought to be benign)、のいずれに相当するかを個々に評価した。主にゲノムコピー数異常の大きさ、異常領域に含まれる遺伝子、および病気の原因とは直接関係のない多型 (benign copy number variations: bCNVs) かどうかを考慮した。「clinically significant」の評価は、検出

したゲノムコピー数異常領域に既知の奇形症候群が知られている場合、あるいは臨床的影響との関連や機能の判明している既知の遺伝子が存在する場合で、且つbCNVs領域でないことを基本的な判断基準とした。

本研究に協力いただいた患者の親に実施したゲノムアレイ解析において、異なる5家系以上に認めたコピー数変化を当研究室における一般成人のbCNVsとして登録した。患者に認めたゲノムコピー数変化が一般成人のbCNVsとして登録されていない場合、協力が得られた場合は両親のアレイ解析を実施し、臨床症状のない親から伝達したことが判明した場合は稀なbCNVsと考えた。さらに、親からの伝達について確認できない場合やde novoであることが判明した場合でも、主に米国人が対象ではあるが、すでに4万件以上の解析からbCNVsとしてGenoglyphix®に登録されているゲノムコピー数変化や、全ゲノムの15963もの座位に、66741種類以上がすでに登録されているDatabase of Genomic Variants (DGV, Nov 2010)の登録データなども参考にした。

「clinically significant」とも「thought to be benign」とも評価を確定できないゲノムコピー数異常については、とりあえず「unclear clinically significance」と評価し仮報告した。

### ③ metaphase FISH 解析

患者のゲノムアレイ解析で検出したゲノムコピー数変化のうち、上記の1)「clinically significant」、2)「unclear clinically significance」と評価した異常のうち、ゲノムコピー数異常に伴う染色体再構成の確認の必要性のある症例について、metaphase FISH解析を検討した。

metaphase FISH解析実施に際しては、まず症例ごとに検出されたゲノムコピー数異常から想定される染色体再構成を考慮し、プローブとして用いるDNAクローンを“Human 32K BAC Re-Array (BPRC)”のライブラリーから必要数選択した。各クローンを培養後アルカリミニプレップ法にてDNAを抽出した。目的に応じて、2～4種類のプローブをそれぞれ異なる波長の蛍光色素を用いてニックトランスレーション法により標識した。調整したDNA溶液を、スライドガラス上に展開した染色体分裂像を含む標本にアプライし、一晚ハ

イブリダイズ後、洗浄・後染色し、蛍光顕微鏡で染色体分裂像あるいは間期細胞核上に表出されたシグナルを観察し、ゲノムコピー数異常に伴う染色体再構成について評価した。

#### (倫理面への配慮)

信州大学の倫理委員会に申請し承認されたゲノムアレイ解析研究として、ゲノムアレイ解析およびmetaphase FISH解析を実施した。各症例の解析結果は主治医に報告した。

## C. 研究結果

### ① 解析対象試料

2010年5月から2011年3月末までに、新規に102名の患者および97名の親からの試料を受け付けた。研究開始時からの累計では、計149名の先天奇形症候群患者[WHS患者20例、既知の染色体異常患者28例、原因不明の多発奇形/精神遅滞(MCA/MR)患者101例]、および計157名の患者の親の試料が収集されたことになる。

WHS患者20例の性別は、女兒が16例、男児が4例であった。20例のうち3症例はG分染法による染色体検査では4p欠失が確認されておらず、全サブテロメアFISH法あるいはBACプローブを用いたターゲットアレイにて4番染色体短腕の微細欠失を診断されていた。

採血後DNA抽出処理開始までの間、適切に保存されていなかったり、凝固・溶血していた血液が数件あり、それらから抽出したゲノムDNAを用いたアレイ解析は、プローブのプロットのStandard Deviationが高く、アーチファクトのコピー数異常が多数検出されるなど、解析に適していなかった。本研究室のアレイ解析においては、質の高いゲノムDNAを準備することが重要であった。

### ② ゲノムアレイ解析

今年度までに試料提供を受けたすべての患者についてゲノムアレイ解析を実施した。患者の親については、患者に検出されたゲノムコピー数変化について結果解釈上の必要性の高い家系から優先的に実施している。

これまでに解析した患者を、WHS患者、既知の染色体異常患者、原因不明のMCA/MR患者に分類し、それぞれについて結果をまとめた。

#### a. WHS 患者

WHS 患者 20 症例のゲノムアレイ解析結果を別添資料の表 1 と図 1 に示した。4 番染色体に認められた欠失の最小サイズは 2Mb, 最大は 29.4Mb であり, 2 例が 4 番染色体の欠失範囲が本ゲノムアレイ解析の精度で一致していたが, 他はすべて欠失範囲が異なっていた。5Mb ごとの分布は 5~10Mb が 9 例と 45% を占め, そのうち 8Mb 台の欠失が 5 例 (25%) と比較的集中していた。また, 欠失のタイプは, 端部欠失 13 例 (65%), 中間部欠失 3 例 (15%), 不均衡型転座 3 例 (FISH 解析未確認症例 1 例を含む) (15%), その他 1 例 (5%) であった。なお, 欠失範囲の一致していた 2 例のうち 1 例は端部欠失, 1 例は不均衡型構造異常であり, 本研究でこれまでにゲノムアレイ解析した 20 症例の WHS 患者は, それぞれ異なる 4 番染色体構造異常を有していた。

#### b. 既知の染色体異常患者

ゲノムアレイ解析前に, G 分染法あるいは FISH 法による染色体検査において染色体異常が判明している, 染色体異常に伴うゲノムの欠失・重複範囲の詳細な特定や染色体再構成の再確認が有用と考えられた 28 症例について, ゲノムアレイ解析結果を別添資料の表 2 に示した。

G 分染法あるいは FISH 法で不均衡型構造異常が判明していた 23 症例のうち低頻度モザイクの症例 14 以外はすべて, 検出されていた構造異常染色体に関して欠失・重複の範囲を詳細に特定できた。由来不明の marker 染色体を有していた 2 症例 (症例 26, 症例 27) はその由来染色体を推測する結果が得られた。不均衡型構造異常 23 症例のうち 7 例 (症例 3, 症例 6, 症例 13, 症例 17, 症例 19, 症例 20, 症例 24) については, 従来の核型分析では確定できない複雑な染色体再構成であったことが, さらにそのうち 1 症例 (症例 17) については構造異常が判明していた以外の染色体領域のゲノムコピー数異常が別途存在していたことが明らかとなった。

不均衡型構造異常のモザイク症例については, 過剰 marker 染色体をモザイクで有していた 1 症例を含む 4 症例: 症例 11 (異常細胞のモザイク頻度: 70%), 症例 15 (30%), 症例 20 (80%), 症例 26 (84%) については, 明らかなゲノムコピー数異常として検出できた。しかし, 症例

14 の +i(12p) (12 番染色体短腕テトラソミー) をごく低頻度に有していることが想定される Pallister-Killian 症候群の 1 症例は, 12 番染色体短腕全領域のゲノムコピー数増加のパターンは認めず, 12 番染色体短腕末端部と短腕ペリセントロメアの一部のみゲノムコピー数増加という結果であった。

また, 均衡型構造異常と考えられていた 4 症例 (症例 1, 症例 4, 症例 12, 症例 22) の解析では, 2 症例 (症例 4, 症例 22) は, bCNVs と考えられるコピー数異常のみであったが, 症例 12 に転座に伴うと考えられるゲノムコピー数減少を, 症例 1 に転座に関係しない領域のゲノムコピー数増加を検出した。

いずれの染色体構造異常も, 判明したゲノムコピー数異常の情報をもとに選択したプローブを用いて, metaphase FISH 解析による染色体再構成の確認が有用であった。

モザイクの倍数性異常を有していた 1 症例 (症例 28) は, bCNVs と考えられるコピー数変化のみであり, 臨床症状に影響している可能性のあるゲノムコピー数異常は検出されなかった。

#### c. 原因不明の MCA/MR 患者

原因不明の MCA/MR 患者 101 例に実施したゲノムアレイ解析の結果, 「clinically significant」と評価したゲノムコピー数異常を認めた 10 症例 (9.9%) を別添資料の表 3 に示した。

また, その他 8 症例 (8.0%) は, bCNVs としては知られていないゲノムコピー数異常を認めたものの, 現時点で患者の臨床症状との関連について確定できず「unclear clinically significance」と評価した。

「clinically significant」と考えられた 10 症例に認めたゲノムコピー数異常の内訳は, コピー数減少 10 ヶ所, コピー数増加 2 ヶ所, コピー数減少のサイズは 549kb~8.3Mb (平均 4.6Mb) であり, コピー数増加のサイズは 1.4Mb と 20.1Mb であった。そのうち一部 (症例 1 : 17q12 重複, 症例 5 : Sotos 症候群, 症例 7 : 15q24 微細欠失) は, ゲノムアレイ解析が普及してきた近年, 症候群として確立してきた微細染色体欠失と一致していた。今後, すべての症例に metaphase FISH 解析による検証と文献的考察を加え, 各患者の臨床症状との関連について評価してゆく。

「unclear clinically significance」と評価した症例を8症例認めたが、そのうち2症例はモザイクの異数性異常あるいはモザイクの構造異常を示唆する結果が得られ、今後 FISH 解析による検証を追加し再評価を行う。残り6例に認めた7ヶ所のコピー数異常はコピー数減少4ヶ所、コピー数増加3ヶ所であり、大きさは159kb~707kbであった。そのうち4症例はまず、今後両親から試料の提供をうけてアレイ解析を実施しての再評価が必要と考える。2症例は両親の解析も実施し de novo の変化であることを確認したが、コピー数異常領域に機能の判明している遺伝子が確認できないため、今後の患者および一般成人の解析結果を蓄積した後に再評価することが必要と考えた。

#### d. 一般成人に認めたゲノムコピー数変化

我々の解析条件でこれまでに解析した患者の親（一般成人）71名のゲノムアレイ解析において、常染色体上に100種類以上のゲノムコピー数変化をひとり0~9個、平均3.8個検出した。その約7割が1名のみで認めたゲノムコピー数変化であった。おそらくそれらも稀な bCNVs と考えられるが、異なる家系の5名以上に共通した以下の計12ヶ所のゲノムコピー数変化領域を、現時点での当研究室における確実な bCNVs と考えた。

常染色体上: 1q44 (37kb), 3p21.31 (125kb), 5q35.3 (190kb), 6p25.3 (73/110kb), 7q36.2 (122kb), 8p11.23 (125kb), 10q11.22 (168kb), 12p13.31 (107kb), 16p12.1 (76kb), 19p12 (81/97kb)

X染色体上: Xp22.33 (102kb), Xq28 (103kb)

### ③ metaphase FISH 解析

ゲノムアレイ解析の結果、その情報をもとに追加の metaphase FISH 解析が必要な症例について、各症例の異常領域ごとに、適切な DNA クロームをデータベースから選択しプローブとして、順次ゲノムコピー数異常に伴う染色体再構成について分子細胞遺伝学的に確認を進めている。

これまでに metaphase FISH 解析を実施した症例のうち、染色体分裂像を実際に確認しながら異常染色体の再構成を確認することが大変有用であった解析例の一部を下記に示す。

#### a. WHS 症候群: 症例 1, 19

WHS 症候群患者の症例 1 と症例 19 はともに、ゲノムアレイ解析にて4番染色体短腕端部のコピー数減少とともに、10番染色体長腕端部のゲノムコピー数増加を認めた。症例 1 の10番染色体長腕端部のゲノムコピー数増加は約770kbであり、症例 19 は約150kbであった。すなわちアレイの結果から細胞遺伝学的には、両症例の異常4番染色体は、短腕端部に10番染色体長腕端部が付加した派生染色体である可能性が示唆されたことになる。

そこで、その検証のため、両症例に10番染色体長腕端部のプローブを用いて metaphase FISH 解析を実施したところ、症例 1 は2本の10番染色体長腕端部に加え派生4番染色体短腕端部にシグナルが観察されたが(図2)、症例 19 は2本の10番染色体長腕端部以外にシグナルを認めなかった(図3)。すなわち、症例 1 の派生4番染色体は4番染色体短腕端部と10番染色体長腕端部との相互転座に由来した不均衡型構造異常であることを確認したが、症例 19 の派生4番染色体は端部欠失を示唆する結果であった。症例 19 では、FISH 解析後に実施した両親のゲノムアレイ解析により父親が10番染色体長腕端部に同じゲノムコピー数増加を有していたことを確認し、症例 19 に認めた10番染色体長腕端部のゲノムコピー数増加は稀な bCNV であったと結論した。

#### b. 複雑構造異常例

G 分染法による核型分析で染色体不均衡型構造異常が判明していた27症例のうち、アレイ解析の結果、G 分染法では判別できない複雑な染色体構造異常であることが示唆され、metaphase FISH 解析により検証できた例を示す。

##### <症例 6 >

G 分染法では2番染色体長腕端部に由来不明の付加染色体が観察されていた。ゲノムアレイ解析の結果、2q35-q36.3領域のコピー数増加と2q端部のコピー数減少を認めた。

metaphase FISH 解析により、異常2番染色体は、2q35-q36.3断片が逆位重複し、さらにその遠位の端部の欠失を伴った構造異常であることが判明した(図4)。

##### <症例 11 >

G 分染法では11番染色体長腕の端部欠失と考えられていた。ゲノムアレイ解析の結果、

11q24.2~q25の約5.7Mbの長腕中間部と11q25の約2.3Mbの長腕中間部の2ヶ所のゲノムコピー数減少を認めた。異常11番染色体長腕末端部は維持されていた。metaphase FISH解析により、異常11番染色体は、11番染色体長腕遠位部の2つの断片の中間部欠失による構造異常であることが判明した(図5)。

#### D. 考察

ゲノムコピー数異常を伴う可能性のある、WHS症候群を含む先天奇形症候群149症例および一部の親について、NimbleGen CGX arrayを用いてCGH法によるゲノムアレイ解析を行った結果をまとめた。一連の解析を通して、臨床応用のための標準化を視野に、解析方法および結果の評価方法などについて検討した。

WHS 症候群は4番染色体短腕の部分欠失が原因の先天奇形症候群のひとつであり、60~70%がG分染法により検出される(GeneTests: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/GeneTests/>)とされていたが、本研究で収集・アレイ解析した20症例については17例(85%)がG分染法により4番染色体短腕の構造異常を指摘されていた。約3Mbの欠失の1症例も検出されていることは、本研究でこれまでに収集・解析したWHS患者は、経験の豊かなdysmorphologistから試料提供を受けており、染色体検査依頼に際して臨床所見からWHS症候群を疑っていることを検査側に伝えていることにより検査精度を上げているのではないかと考えられた。これまでに収集・アレイ解析した原因不明のMCA/MR患者101例にWHS症候群は認めなかった。4番染色体短腕の欠失のサイズは最小が2.0Mb、最大は29.4Mbであり、8Mb台の欠失が5例(25%)と比較的集中していた。端部欠失13例(65%)、中間部欠失3例(15%)、不均衡型転座3例(FISH解析未確認症例1例を含む)(15%)、その他1例(5%)であり、20症例のWHS患者はそれぞれ異なる4番染色体構造異常を有していた。

既知の染色体異常症28例を対象としたゲノムアレイ解析により、各症例の分子レベルの量的不均衡を明らかにできたことは、過去の報告例と比較することにより患者の診療に役立てられるのみならず、今後の医学の発展に

寄与できる可能性もあり大変有用であった。またそのうち、8症例(29%)に複雑な染色体再構成が確認され、染色体構造異常の発生メカニズムが従来想定されていたより非常に複雑であることが示唆され、アレイ解析の結果を細胞遺伝学的視点で解釈することの重要性を再認識できた。さらに、アレイ解析が将来臨床検査として実施される場合に必要な知識として、実際のアレイ解析結果で検出されるコピー数異常と染色体再構成の関係を比較したり、ゲノムコピー数異常として検出されない染色体構造異常を改めて認識するためにも有用であった。

G分染法あるいはFISH法で不均衡型構造異常が判明していたモザイク症例の解析結果からは、異常細胞が30%頻度あれば当研究室の解析精度においてはゲノムアレイ解析による診断が可能と考えられた。

12番染色体短腕の同腕染色体を過剰にモザイクに有することが想定されるPallister-Killian症候群の1症例については、ゲノムコピー数は想定される染色体異常のパターン(12番染色体短腕全域のコピー数増加)には検出されず、12番短腕短腕末端部と短腕ペリセントロメアの一部のみがゲノムコピー数増加という結果であった。モザイク頻度が非常に低いことによる検出限界と考えられたが、この結果はアレイ解析においてゲノムのすべての領域が均等の検出感度を有してはいないことを示唆していると考えられた。

均衡型構造異常4例の解析結果は、症例12に転座に伴うと考えられるゲノムコピー数減少を、症例2に転座に関係しない領域のゲノムコピー数増加を検出しアレイ解析の威力を発揮した。一方、bCNVsのみと考えられた2症例からは、わが国でゲノムアレイ解析が日常検査として利用できるようになったとしても、分染法による核型分析が必要であることを改めて示す結果であった。

原因不明のMCA/MR患者101例に実施したゲノムアレイ解析の結果、現時点でゲノムコピー数異常を認めた10症例(9.9%)を「clinically significant」と評価した。3症例が端部のコピー数異常で、そのうち1症例がコピー数増加、2症例がコピー数減少であっ

た。中間部のコピー数異常であった7症例はすべてコピー数減少であった。コピー数減少のサイズは549kb~8.3Mb(平均4.6Mb)であった。そのうち一部は、ゲノムアレイ解析が普及してきた近年、症候群として確立してきた微細染色体欠失と一致していた。コピー数増加を認めた1例のサイズは20.1Mbなので、G分染法で異常が見逃されていた可能性が高いと考えられ、G分染法による再評価の意義もある。

bCNVsとしては知られていないゲノムコピー数異常を認めたものの、現時点で患者の臨床症状との関連があると確定できなかった8症例(8.0%)を「unclear clinically significance」と評価した。8症例のうち2症例は、モザイクの異数性異常あるいはモザイクの構造異常を示唆する結果が得られ、今後FISH解析による検証を追加することにより「clinically significant」と再評価できる可能性がある。残り6例に認めた7ヶ所のコピー数異常は、今後両親から試料の提供をうけてアレイ解析を実施し、臨床症状のない親からの伝達であることが確認されれば「thought to be benign」と再評価することになる。De novoであることが確認された場合には、さらにデータが蓄積された後に改めて再評価することが必要と考える。

Copy Number Variation (CNV)は、マイクロアレイ解析技術の普及に伴い新たな多型として認識された100bp~3Mbのdeletion, duplicationなどのコピー数変化で、DGVに全ゲノムの15963もの座位に、66741種類以上がすでに登録されている。ゲノムアレイ解析技術は、全ゲノムを対象として数十kb程度の微細なゲノムコピー数変化の検出を可能としたが、CNVに関する情報は未だ十分でない。健常人においても5個程度存在し、アレイのプラットフォームやレファレンスとして用いるDNAによってもデータに差が生じうるため、検出されるゲノムコピー数変化が臨床的に意味のある異常かどうかについて適切に臨床的評価をするために、研究室ごとに臨床的影響がないと考えられる領域(bCNVs)についての判定基準を定める必要性が指摘されている(Shaffer, 2007)。

本研究の解析経験から、現時点で、1q44

(37kb), 3p21.31 (125kb), 5q35.3 (190kb), 6p25.3 (73/110kb), 7q36.2 (122kb), 8p11.23 (125kb), 10q11.22 (168kb), 12p13.31 (107kb), 16p12.1 (76kb), 19p12 (81/97kb), Xp22.33 (102kb), Xq28 (103kb)の12箇所を当研究室におけるbCNVとした。これらのうち、同じプラットフォームで既に45000件以上の解析を実施している米国Signature Genomics社のbenign CNV callと完全一致した領域は10q11.22と16p12.1のみで、1q44, 3p21.31, 6p25.3, 8p11.23, 12p13.31は一部共通、7q36.2と19p12はDGVに類似する領域の登録はあったが同社の基準では登録されていなかった。今後一般成人のゲノムアレイ解析結果を蓄積してゆくことで、本研究の解析精度における日本人bCNVsの登録は増えることが想定される。

本研究のゲノムアレイ解析結果の臨床的評価を通じて、いくつかの点においてその複雑さを実感した。ひとつは、一般成人にしばしば観察されるゲノムコピー数異常で、bCNVsと判断されている領域に既知の遺伝子を含んでいる場合があることであった。すなわち既知の遺伝子にゲノムコピー数異常があっても臨床的な影響がない場合もありうるということである。さらに、両親から由来していない患者のみに認めたゲノムコピー数変化のなかに登録されたbCNVsと一致したものもあり、de novoであっても必ずしも臨床症状と関連しないこともあるということであった。また、de novoのゲノムコピー数変化であることが確認されたものの、その領域に既知の遺伝子が存在していない場合も少なくなく、その場合は臨床症状への影響は不確定と判断せざるをえなかった。

ゲノムアレイ解析の臨床応用に際しては、患者に認めたゲノムコピー数異常についての結果解釈の標準化が必要となると考えられた。

## E. 結論

ゲノムコピー数異常を伴う可能性のある、ウォルフヒルシュホーン症候群を含む先天奇形症候群を対象として実施した149症例のゲノムアレイ解析を通して、臨床応用のための標準化を視野に、解析方法および結果の評価方法について検討した。

ゲノムアレイ解析は、従来の染色体検査では検出できない微細なゲノムコピー数異常を

検出可能とする今後の医療に必須となる大変有用な診断法である。既知の染色体異常患者のゲノムアレイ解析により、染色体構造異常は従来考えられていた以上に複雑なメカニズムで生じていることが推測されたため、ゲノムアレイ解析を臨床検査として適切に実施してゆくためには、必要に応じて両親のアレイ解析や患者および両親の metaphase FISH 解析による染色体再構成の検証を実施できるよう、採取した血液は直接 DNA 抽出するとともに染色体検査用に固定細胞も準備することが必要である。ゲノムアレイ解析の結果は、G 分染法による核型分析や metaphase FISH 解析の結果とともに、細胞遺伝学的に総合的に解釈することが重要で、そのためにも細胞遺伝学の専門家の人材育成が重要課題と考えた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

涌井敬子，古庄知己，鳴海洋子，福嶋義光：  
分染法にて構造異常が判明した症例への  
Cytogenetic Array 解析をきっかけとして確  
認された複雑染色体構造異常。日本人類遺伝  
学会第 55 回大会，さいたま，2010.10.28

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

<別添試料>

表 1. WHS 患者のゲノムアレイ解析結果. 4 番染色体短腕の欠失範囲の詳細と 4 番染色体短腕以外の染色体端部に認めたゲノムコピー数増加領域, および以上から明らかにされた 4 番染色体構造異常の種類. 症例 1, 3, 4 は G 分染法による染色体検査では 4p 欠失を認められておらず, 全サブテロメア FISH 法あるいは BAC プロブを用いたターゲットアレイにて診断された.

症例	性別	4 番染色体短腕のゲノムアレイ結果			4 番染色体短腕以外に検出した他染色体端部のゲノムコピー数増加領域 [サイズ]	4 番染色体構造異常の種類
		欠失バンド	欠失範囲	欠失サイズ [Mb]		
1	F	4p16.3	63075-2061942	2.00	10qter [0.77 Mb]	unbalanced translocation
2	F	4p16.3	63075-2934119	2.87	4qter [45.56 Mb]	rearranged
3	F	4p16.3-4p16.2	63075-3453423	3.39		terminal deletion
4	F	4p16.3-4p16.1	63075-5259705	5.20		terminal deletion
5	F	4p16.3-4p16.1	33860-5488869	5.46		terminal deletion
6	F	4p16.3-4p16.1	33860-6920095	6.89		terminal deletion
7	M	4p16.3-4p16.1	63075-7509074	7.45		terminal deletion
8	F	4p16.3-4p16.1	63075-8089462	8.03		terminal deletion
9	M	4p16.3-4p16.1	63075-8772114	8.71		terminal deletion
10	F	4p16.3-4p16.1	33860-8772114	8.74	8pter [2.03 Mb]	unbalanced translocation
11	F	4p16.3-4p16.1	33860-8772114	8.74		terminal deletion
12	F	4p16.3-4p16.1	1370178-10219850	8.85		interstitial deletion
13	F	4p16.3-4p15.33	63075-11105238	11.04		terminal deletion
14	M	4p16.1-4p15.32	5776985-17810150	12.03		interstitial deletion
15	F	4p16.3-4p15.33	841095-14467735	13.63		interstitial deletion
16	F	4p16.3-4p15	63075-15700625	15.64		terminal deletion
17	F	4p16.3-4p15.31	63075-18616970	18.55		terminal deletion
18	F	4p16.3-4p15.31	63075-20992651	20.93	11qter [1.27 Mb]	susp. unbalanced translocation *metaphase FISH 未確認
19	F	4p16.3-4p15.1	33860-28348051	28.31	10qter [0.15 Mb]	terminal deletion *FISHにて10qterはder4pに転座していないことを確認した.
20	M	4p16.3-4p15.1	63075-29416450	29.35		terminal deletion



表2. 既知の染色体異常患者のゲノムアレイ解析結果

症例	既知の染色体異常	分類	アレイ解析により判明したゲノムコピー数異常			判明した染色体再構成 (分類)
			コピー数変化	band	size	
1	t(1;16)(p36.3;p11.2)	b	?gain	16qter	2.3Mb	terminal duplication *転座と別のコピー数異常 or bCNV
2	add(1)(q42)	ub	loss	1qter	8.2Mb	terminal deletion
3	der(1)(pter->q44::q44->q41:)	ub	gain	1q41-1q44	30.2Mb	complex abnormality
			loss	1qter	725.8kb	
4	inv(2)(p23q33)dn	b				susp CNV only
5	del(2)(q14q21)	ub	loss	2q14-q21	13Mb	interstitial deletion
6	add(2)(q37.3)	ub	gain	2q35-q37.2	18.9 Mb	complex abnormality
			loss	2qter	6.2Mb	
7	add(2)(q35)	ub	loss	2qter	10Mb	terminal deletion
8	add(2q)	ub	loss	2q35-q36.3	8.4Mb	interstitial deletion
9	del(4)(q34)	ub	loss	4q34	8.8Mb	interstitial deletion
10	del(6)(q16.2q22.2)	ub	loss	6q16-q21	15Mb	interstitial deletion
11	mos add(7)(q36) *70%	m_ub	gain	7qter	13.4Mb	terminal duplication
12	t(7;10)(q31.3;q23.2)	b	loss	7q31	4.3Mb	interstitial deletion *転座切断点の微細欠失疑い。
13	add(11)(q22.2)	ub	loss	11q24	5.7Mb	complex abnormality
			loss	11q25	2.3Mb	
14	nuc ish mos (12pterx4) *数%	m_ub	gain	12pter	7.3Mb	complex abnormality *モザイク頻度が低くアレイ解析では+i(12p)を正確に検出できていない
			gain	12p pericen	81kb	
15	mos del(13)(q12.3q22) *30%	m_ub	loss	13q13-q31	49Mb	interstitial deletion
16	del(13)(q22q32)	ub	loss	13q22.1-13q32.1	20.1Mb	interstitial deletion
			loss	10q11.23-q21.1	2.2Mb	
			loss	13q32-q33	9.2Mb	
17	add(13)(q22)	ub	loss	13q42	8.5Mb	complex abnormality
			loss	13q32-q33	9.2Mb	
			loss	13q42	8.5Mb	
18	del(17)(p13)	ub	loss	17p13.2-q13.1	3.2Mb	interstitial deletion
19	add(17)(p13)	ub	gain	7pter	27.5Mb	complex abnormality
			gain	17p13.3	1.2Mb	
20	mos r(18)(p11.2q23) *80%	m_ub	loss 18p	18p		complex abnormality
			loss 18q	18q		
21	der(21)t(8;21)(p22;q22.3)	ub	gain	8pter	13.7Mb	terminal duplication
			loss	21qter	5.5Mb	terminal deletion
22	t(X;6)(q26;p11.2)dn	b				susp CNV only
23	der(X;15)(q28;q11.2)	ub	loss	Xq28	5.8Mb	terminal deletion
			?loss	15q11.2	263.9 kb	
24	add(X)(q28)	ub	gain	Xpter	17.3Mb	complex abnormality
			gain	Xq22.1-q28	51.0Mb	
			loss	Xqter	1.6Mb	
25	der(X;16)(q28;p13.1)	ub	loss	Xq28	6.4Mb	
			gain	16pter	27Mb	
26	mos +mar *80%	m_ub	gain	13q12	9.5Mb	markerは13番セントロメア近傍と推察
27	+18,+2mar	ub	gain	18pter-18qter		
			?gain	7cen	5.16 Mb	
28	mos 92,XXXX *47%	m_p				susp CNV only

b: balanced, ub: unbalanced, m\_ub: mosaic unbalanced, m\_p: mosaic polyploidy

表3. 原因不明のMCA/MR患者のゲノムアレイ解析により、新たに臨床的に影響のあるゲノムコピー数異常が明らかにされた症例の結果

症例	アレイ実施前の 染色体検査結果	アレイ解析により判明した ゲノムコピー数異常			判明した染色体再構成 (分類)
		コピー数 変化	band	size	
1	46, XX	loss	1p21-p13	8.3Mb	1p interstitial deletion
		gain mat	17q12	1.4Mb	17q interstitial duplication * <i>Renal cysts and diabetes (RCAD) region</i>
2	46, XX	loss	1q23-q24	7.0Mb	1q interstitial deletion
		loss	16q21	1.3Mb	16q interstitial deletion * <i>bCNV?</i>
3	46, XY. ish subtel (41x2)	loss	1q44	0.5Mb	1q interstitial deletion
4	46, XY	loss	4q21	5.2Mb	4q interstitial deletion
5	46, XX	loss	5q35	1.9Mb	5q interstitial deletion * <i>incl. Sotos syndrome region</i>
6	46, XX. ish subtel (41x2)	gain	9qter	20.1Mb	9q terminal duplication
7	46, XY	loss	15q24	3.4Mb	15q interstitial deletion * <i>o/1 15q24.1-q24.3 Microdeletion region</i>
8	46, XY	loss	14qter	5.2Mb	14 qterminal deletion
9	46, XX	loss	19p13.3	2.2Mb	19p interstitial deletion
10	46, XY	loss	21qter	7.4Mb	21q terminal deletion

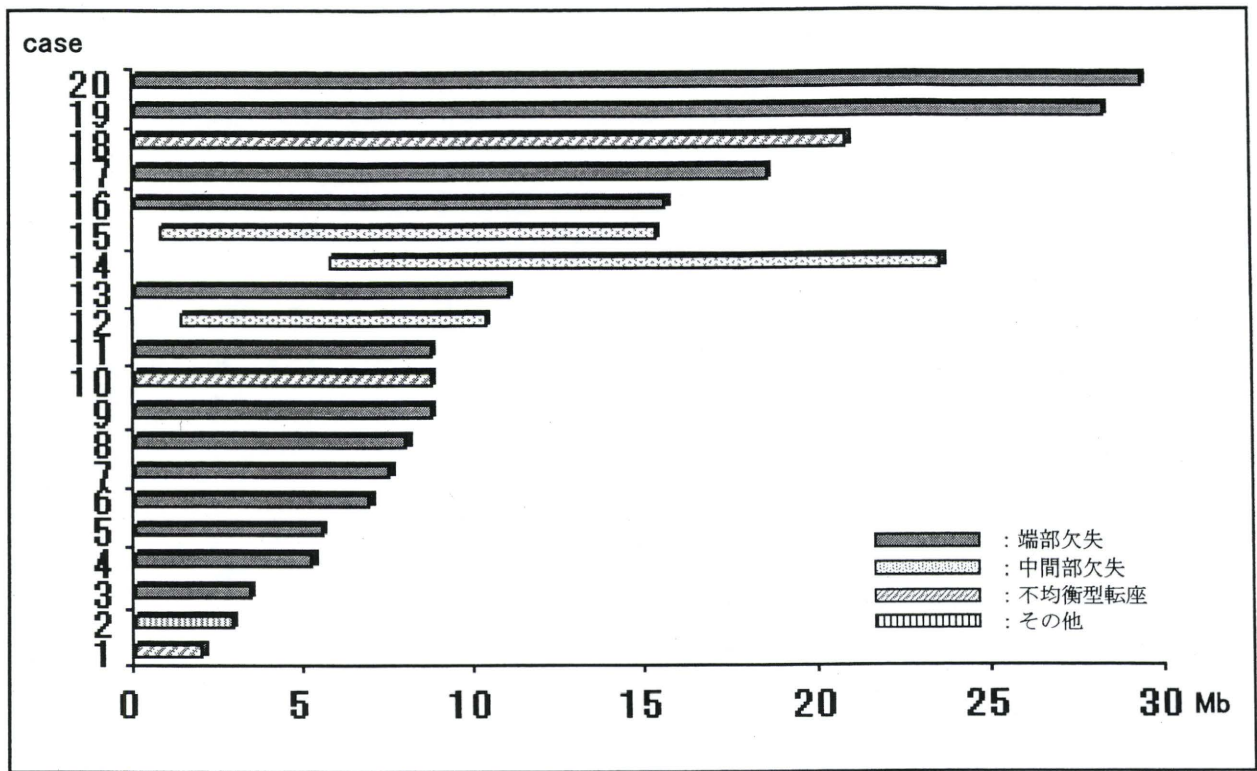


図1. WHS患者の4番染色体短腕の欠失範囲とその種類.

4番染色体の構造異常を、端部欠失、中間部欠失、不均衡型転座、その他に分類し、4番染色体短腕末端部を0とした、各症例の4番染色体短腕の欠失範囲を欠失の大きさ順に示した。

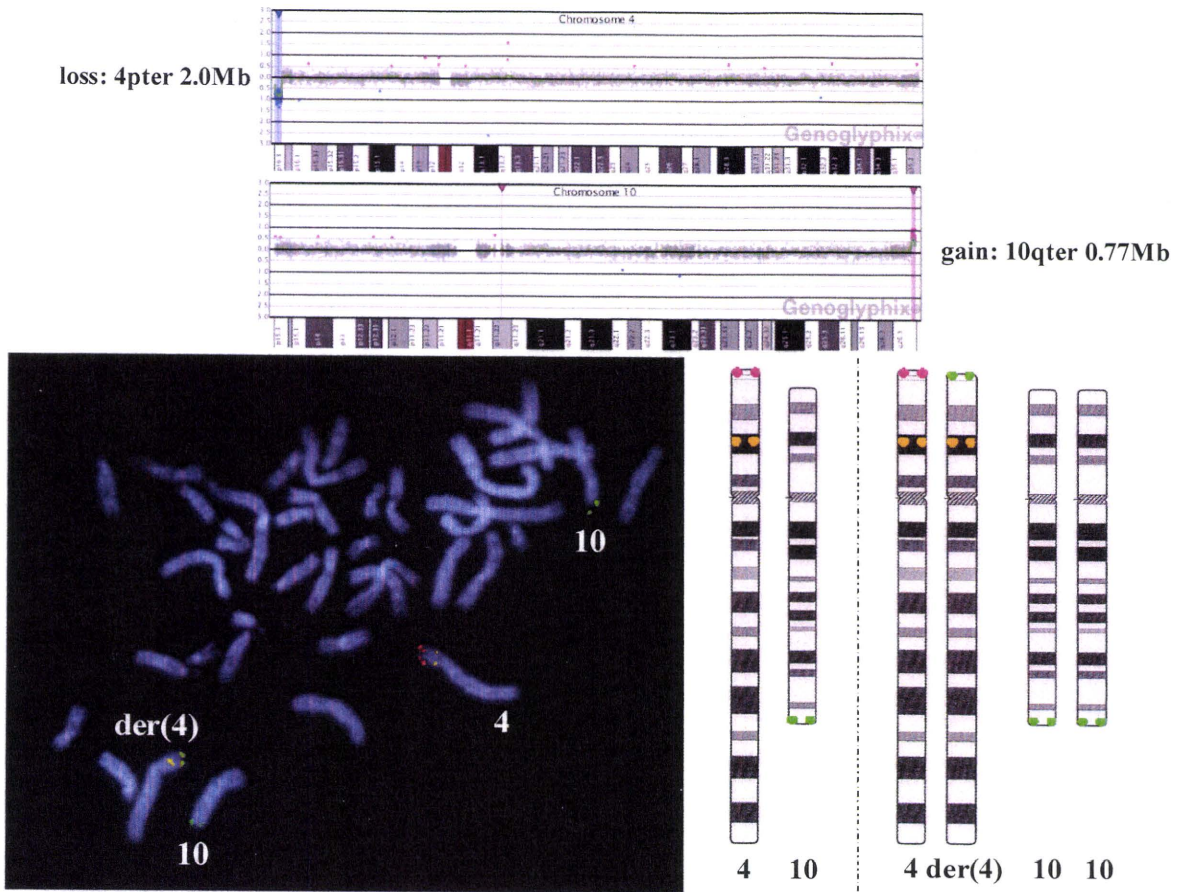


図2. WHS 症候群：症例1のゲノムアレイ解析結果（上）と metaphase FISH 解析結果（下）

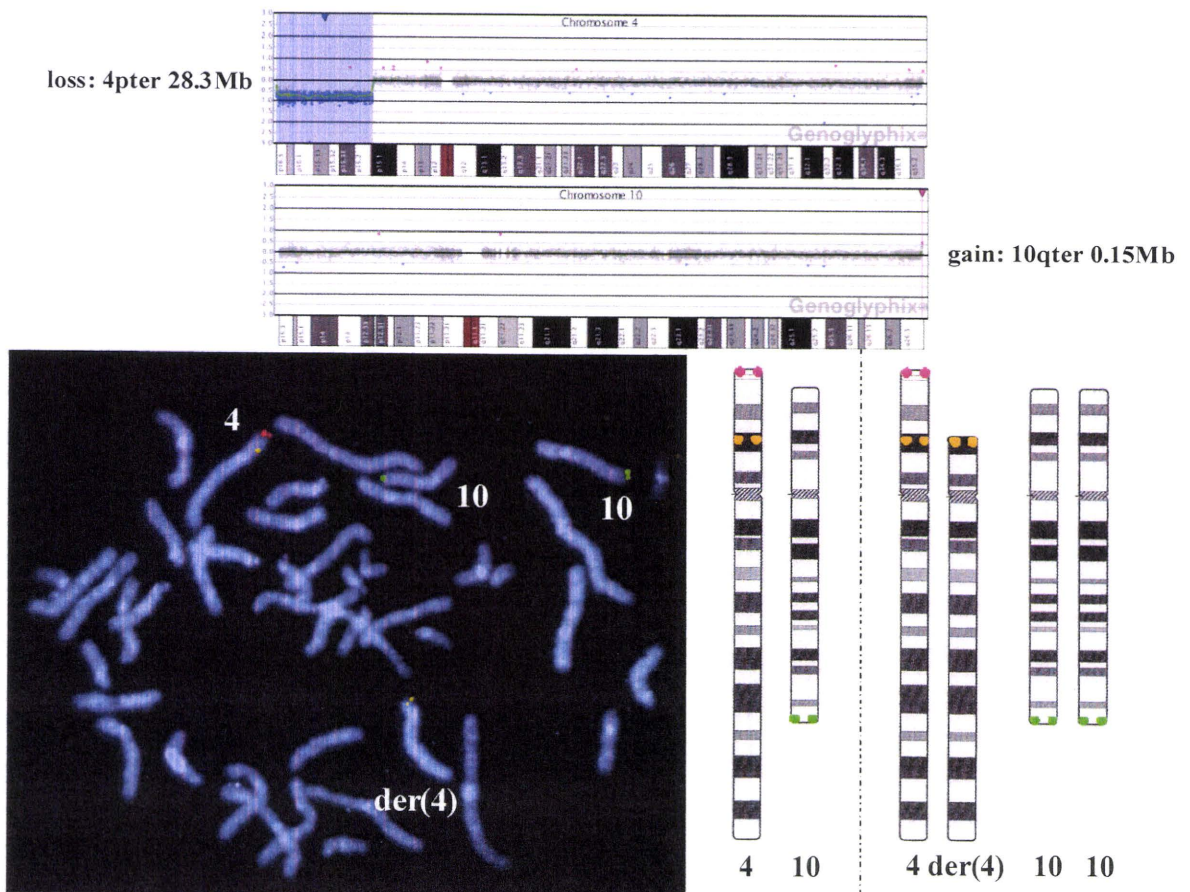


図3. WHS 症候群：症例19のゲノムアレイ解析結果（上）と metaphase FISH 解析結果（下）